

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU
DOSAGE DES PROTÉINES PAR
LA RÉACTION DU BIURET

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

PRÉSENTÉE PAR

ABBASS KHODABANDEH

Pharmacien de la Faculté de Pharmacie de Téhéran (Iran)

Diplômé de Microbiologie, Sérologie et Immunologie de l'Institut Pasteur de Paris

Titulaire de Certificats d'Hématologie et de Coprologie de la Faculté de Médecine de Paris

MEMBRES DU JURY :

MM. P. FLEURY, Président,
J.-E. COURTOIS, Professeur,
A. GERMAN, Maître de Conférence.



JUIN 1955

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DOSAGE DES PROTÉINES PAR LA RÉACTION DU BIURET

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

PRÉSENTÉE PAR

ABBASS KHODABANDEH

Pharmacien de la Faculté de Pharmacie de Téhéran (Iran)

Diplômé de Microbiologie, Sérologie et Immunologie de l'Institut Pasteur de Paris

Titulaire de Certificats d'Hématologie et de Coprologie de la Faculté de Médecine de Paris

MEMBRES DU JURY :

MM. P. FLEURY, Président,
J.-E. COURTOIS, Professeur,
A. GERMAN, Maître de Conférence.



JUIN 1955



PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. René FABRE Doyen C. *,  I.
R. DELABY Assesseur, O. *,  I.
G. CUVIER Secrétaire Général, () I.
L. JEANDEL Secrétaire,  I.
E. BUVAT Commis,  I.
A. QUILLIOT Rédacteur
Mlle. M. DENNY Rédactrice
Mme. M.L. ESPINASSE . Rédactrice,  A.

PROFESSEURS

MM. FABRE, C. *,  I. Toxicologie
DELABY, O., *,  I. Pharmacie chimique
FLEURY, *,  I. Chimie biologique
PICON, O. *,  I. Chimie minérale
MASCRE, O. *,  I. Botanique
JANOT, *,  I. Pharmacie galénique
CHARONNAT, *,  I. Chimie organique
VALETTE, *,  I. Pharmacodynamie
BEDEL, *,  I. Législation, Déontologie et
Histoire de la Pharmacie.
PARIS, *,  A. Histoire naturelle des
Médicaments simples d'origine
végétale.
GUILLOT, *,  A. Physique.
GAUTIER, *,  I. Chimie analytique
LAMBIN (Mlle) *,  I. Microbiologie
RAOUL, () A. Zoologie appliquée
DOMANGE, *,  I. Professeur à titre personnel
COURTOIS, *,  A. Professeur à titre personnel
CRETE,  A. Professeur à titre personnel
CAVIER,  I. Professeur sans chaire
MORETTE, *,  A. Professeur sans chaire
TRUHAUT, *,  I. Professeur sans chaire

Doyen honoraire: M. RADAIS C. *,  I.

Professeurs honoraires: MM. DELEPINE, C. *,  I. et
LEBEAU, C. *,  I.
membres de l'Institut

BOUGAULT, C. *,  I.
HERISSEY, C. *,  I.
LAUNOY, O. *,  I.

MAITRES DE CONFERENCES

MM. MOREAU, (C) A. Sciences physiques et chimiques
GUY Sciences physiques et chimiques
GERMAN, (C) A. Sciences naturelles
PIETTE (C) A. Sciences naturelles
QUEVAUVILLER (C) A. Sciences naturelles

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. CORRIEZ, (C) I. Physique
HARISPE, (C) A. Chimie générale et pharmaceutique
DEYSSON Botanique
GIRARD, (C) A. Chimie biologique
MANGEOT, (C) A. T.P., 4me année
RENAULT H. (C) A. Chimie analytique
DESVIGNES Microbiologie
BORY Sérologie
N Biologie animale

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL (C) A. Pharmacotechnie galénique
WAROLIN Pharmacotechnie chimique
N.. Pharmacodynamie.

BIBLIOTHEQUE

Conservateur M. GARNIER, *, (C) I.
Bibliothécaires Mlle LAVAUD, (C) I.
Mme KREHMER.

A Monsieur le Professeur Paul FLEURY

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Académie Nationale de Médecine
Pharmacien en Chef Honoraire des Hôpitaux Psychiatriques
de la Seine
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a fait le grand honneur de
présider la soutenance de cette thèse
dont il nous avait confié le sujet.

Hommage de très respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean COURTOIS,

Professeur d'Hydrologie à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a constamment encouragé
au cours de notre travail.

Hommage de profonde reconnaissance.

A Monsieur Albert GERMAN

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

Qui a bien voulu examiner ce travail.

Très respectueux hommage.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552212_0059

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A mon Père

A mes Soeurs

A mon Beau-Frère

A tous les miens.

A mes Maîtres de l'Université de Téhéran,

Hommage de profonde gratitude.

Ce travail entrepris depuis bientôt quatre ans fût exécuté au Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris.

Nous dûmes, pour préparer nos matériels, visiter les différents centreshospitaliers et municipaux. De nombreux prélèvements furent pratiqués souvent dans les endroits très éloignés du Laboratoire. Néanmoins, ce travail peut paraître incomplet mais nous demandons à nos juges de daigner simplement le considérer comme une modeste contribution à la biologie clinique et de bien vouloir reconnaître, au moins, l'effort consciencieux que nous avons tenté pour le réaliser.

Notre travail comprend deux études distinctes qui ont comme seul lien l'emploi, dans les deux cas, de la méthode de détermination des protéines par la réaction du biuret, selon la technique de Gornall, mise au point par Monsieur le Professeur P. Fleury et Mademoiselle Eberhard, qui ont déjà étudié quelques unes de ses applications en biologie clinique.

Il s'agit, d'une part, du dosage du fibrinogène du sang et, de l'autre, du dosage des protéines du lait.

Ces études ont eu pour but de continuer, dans le cadre de ce laboratoire, de développer les applications de cette méthode si commode et si fidèle et d'en montrer ainsi toute la fécondité.

Nous ne pouvons pas exprimer, en quelques lignes, toute la reconnaissance que nous éprouvons à l'égard de nos éminents Maîtres, Monsieur le Professeur P. Fleury et Monsieur le Professeur J.E.Courtois, qui nous ont reçus avec tant de bonté. Ils nous ont d'abord permis de voir dans quel esprit était donné l'enseignement en France, en nous

conseillant de suivre les cours et les travaux pratiques de Certificat de chimie biologique appliquée et le Certificat d'études spéciales de sérologie de la Faculté de Pharmacie ainsi que le grand cours de microbiologie et de sérologie et immunologie à l'Institut Pasteur de Paris et, enfin, le Certificat d'hématologie et coprologie à la Faculté de Médecine de Paris.

Je tiens à remercier Mr. le Professeur German, alors Chef des Travaux Pratiques de Sérologie et Mr. le Docteur Girard, Chef des Travaux Pratiques de 5^e année, Monsieur Leclerc, assistant dévoué de la Chaire de Chimie biologique, de leur accueil si bienveillant, ainsi que les Maîtres de l'Institut Pasteur et de la Faculté de Médecine.

Mr. le Professeur P. Fleury a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous a fait l'honneur de nous admettre parmi ses élèves.

Après nous avoir donné le sujet de cette thèse, il s'y est constamment intéressé, prenant sans compter sur le temps de ses propres travaux. Nous n'oublierons jamais, ni ses précieux conseils ni le magnifique exemple qu'il donne à tous par son ardente activité et son esprit de haute conscience.

Très sensibles à l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider notre jury de thèse, nous lui présentons nos respectueux hommages. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre admiration et de notre profonde gratitude.

Nous prions Mr. le Professeur J.E. Courtois, d'agréer l'expression toute particulière de notre reconnaissance pour la bienveillance avec laquelle il nous a encouragés et conseillés. De plus, il nous a

fait l'honneur de participer à notre jury d'examen; nous désirons lui exprimer nos sentiments de très sincère gratitude.

Nous sommes très sensibles à la faveur que nous a faite, Mr. le Professeur German de participer à notre jury de thèse et nous lui en sommes particulièrement reconnaissants.

Nous associerons à ces remerciements, Mr. le Docteur Girard, Chef de Travaux pratiques, pour les encouragements constants et la sympathie qu'il nous a donnés.

Nous avons eu l'incalculable avantage d'avoir comme conseiller, Monsieur Leclerc, assistant de Chimie biologique; son aide nous a été d'un précieux concours et son inlassable complaisance nous a permis d'oser en abuser. Nous lui adressons ici nos remerciements les plus sincères.

Souvent, nous avons distrait de ses propres recherches, Mademoiselle Eberhard. Nous la remercions pour son aide si précieuse.

Nous garderons un très bon souvenir de nos confrères de laboratoire qui y créèrent une agréable ambiance de recherche et d'amitié.

1^{re} P A R T I E

DOSAGE DU FIBRINOGENE

A L' AIDE DE LA METHODE AU BIURET

Chapitre Premier

ETUDE CRITIQUE DU DOSAGE DU FIBRINOGENE PLASMATIQUE

Le fibrinogène est l'un des constituants les plus importants du plasma. Son rôle dans la coagulation sanguine n'est pas le seul qu'il possède. Ce n'est là qu'un aspect des propriétés de cette grosse molécule protidique, son aptitude à se polymériser. Grâce à cette propriété, il intervient de même pour colmater certaines plaies ou obturer certains vaisseaux.

Longue et grosse molécule, le fibrinogène participe, chez les vertébrés, à la plupart des changements sol-gel de la matière vivante. Elle règle la viscosité du plasma; son abondance chez un sujet, peut faire redouter des accidents circulatoires; sa présence normale entraîne la fatigue d'un système cardio-vasculaire déficient. Elle est l'un des facteurs qui interviennent dans les réactions dites non spécifiques des protides.

Synthétisé pour une moitié par le foie, son dosage peut renseigner sur l'état fonctionnel de cet organe.

Parmi les cas pathologiques les plus importants à connaître pour l'analyste, figurent les grandes fibrinopénies: les afibrinémies, car c'est généralement dans ces cas que le dosage est important et que la technique est défailante. On admet habituellement que la teneur normale du plasma en fibrinogène est de l'ordre de 3 à 5 g/l; on désigne alors sous le nom de fibrinopénies, les états dans lesquels la fibrinémie est inférieure à 3 g/l, et, parmi ceux-ci, hypofibrinémies, ceux dans lesquels elle est de l'ordre de 1,50 g/l et, afibrinémies,

l'absence à peu près totale (0 - 0,5 g/l) de ce protide. Or, dans ces cas, se posent avec acuité des problèmes propres à la microanalyse (précision des mesures, dissolution des précipités au cours des lavages, adsorption de composés étrangers au cours des isolements...) principalement lorsque le malade est un enfant et que la prise d'essai doit être petite. Il ne faut pas perdre de vue cet aspect du problème lorsqu'on passe en revue les principaux types de méthodes décrites.

Aussi, souhaitons nous tout d'abord énoncer rapidement les principaux caractères analytiques du fibrinogène qui peuvent servir à son identification= coagulation à 56° avec apparition d'un trouble dans le milieu, précipitation par les sels neutres à concentration convenable (25 pour cent de la saturation en sulfate d'ammonium par exemple), électrophorèse comparée du plasma et du sérum (migration intermédiaire entre celle des α et des β globulines).

Le dosage du fibrinogène -on l'appelle aussi souvent dosage de la fibrine- se fait le plus souvent par coagulation de fibrine dans le milieu. Cependant, on peut encore séparer le fibrinogène lui-même ou même concevoir un dosage sans isolement.

I/ Dosage du fibrinogène plasmatique sans isolement

On peut dire, avec une approximation suffisante, que le sérum ne diffère du plasma que par l'absence du fibrinogène. Deux dosages semblables, l'un fait sur le plasma, l'autre sur le sérum, ne seront donc pas identiques et la différence correspondra au fibrinogène. Tous dosages convenables sont possibles, même les plus simples, telles les mesures

de densité au moyen des gammes de solutions de sulfate de cuivre (J.Araya Araya). En fait, ces techniques ne sont pas satisfaisantes pour l'esprit, car l'écart est faible entre la somme des erreurs relatives faites sur chaque dosage et le résultat cherché.

2/ Séparation du fibrinogène

L'électrophorèse sépare le fibrinogène des autres protides. On peut donc l'évaluer quantitativement comme on fait des autres fractions protidiques, mais les résultats obtenus ainsi sont justiciables des critiques que l'on peut faire aux mesures des taches colorées obtenues, spécialement lorsque peu de fibrinogène se trouve placé à côté d'assez grandes quantités de globulines.

On a plutôt recours aux techniques de relargage. Tous les systèmes peuvent être utilisés, ceux qui reposent sur l'emploi^{de} sels neutres principalement, et nous avons nous-mêmes essayé une de ces techniques en partant du mode opératoire indiqué par Marenzi. Le mémoire publié par Ardry en 1954, indique un certain nombre de concentrations en sels neutres relargant le fibrinogène. On y trouve surtout une représentation graphique permettant de déterminer par calcul la concentration à laquelle doit être utilisé un sel nouveau, lorsque l'on connaît ses propriétés relargantes pour deux fractions protidiques déterminées. L'une des principales critiques que l'on puisse faire à ces méthodes est que les protides relargués ne sont pas uniquement du fibrinogène mais qu'il s'y associe, soit par relargage, soit par entraînement, des fractions protidiques différentes. Parmi celles-ci, la fibrinoglobuline dont la séparation avec le fibrinogène n'est guère possible que par

l'action de la thrombine.

3/ Transformation du fibrinogène en fibrine et mesure d'opacimétrique

Quelques auteurs ont proposé de mesurer le trouble qui se produit dans le plasma lorsqu'on relargue le fibrinogène, W. Gerok par exemple. Le plus souvent on mesure le trouble dû à la fibrine.

Lorsque dans un plasma, le fibrinogène se transforme en fibrine, il se produit en effet un trouble dont on peut évaluer l'intensité avec un appareil de mesure (P. Meunier en 1940 - C. Lian et R. Sassier en 1942) Mieux, on peut suivre l'apparition de ce trouble et le dosage traduit plus la cinétique de la réaction que la concentration en fibrinogène du plasma.. Il s'agit surtout de juger de la qualité de la coagulation. Tout d'abord, après addition de l'agent coagulant, il ne se produit rien, puis le milieu s'opacifie régulièrement et, au bout d'un certain temps, l'opacité reste constante. On peut donc tracer une courbe de l'opacité en fonction du temps dont l'aspect varie avec les différents états pathologiques. Elle varie aussi sous l'influence de différents facteurs, ce qui oblige à manipuler avec une grande rigueur technique. C'est ainsi que, par exemple, l'aspect des courbes change avec la nature et la concentration de l'anticoagulant, qu'une centrifugation trop poussée qui lyse les plaquettes, abaisse les temps, que l'examen doit être fait aussitôt après le prélèvement pour que la prothrombine ne soit pas détruite ...

4/ Recalcification d'un plasma décalcifié

Il s'agit, comme dans le paragraphe suivant, d'une coagulation obtenue au moyen de la thrombine mais ici c'est la thrombine du

plasma lui-même qui agit lorsqu'on ajoute les ions calcium nécessaires à la réaction. La technique de Sassier (C. Lian, R. Sassier -1936) qui est classique en France et que nous avons longtemps prise comme technique de référence, est fondée sur ce principe. Le plasma citraté ou oxalaté est traité par une solution calcique chlorurée et abandonné à la coagulation. On estime qu'en une heure, la coagulation est pratiquement terminée et on isole la fibrine au bout de trois heures au plus, pour le cas où il se produirait alors une fibrinolyse. Or, il a été démontré qu'en fait, la formation de fibrine se poursuit encore après ce temps et qu'elle dure toujours après 24 heures (Laruelle). En outre, la fibrinolyse qui, lorsqu'elle se produit, n'apparaît à la vue qu'après 3 heures environ, a vraisemblablement commencé avant. De sorte que la technique de Sassier est un compromis entre la fibrine qui se forme et celle qui se détruit.

Ces remarques n'enlèvent rien à la valeur de cette technique mais ne permettent pas cependant, comme nous l'avons fait, de l'utiliser comme technique de référence. Une telle technique doit être rapide et, de ce fait, utiliser une thrombine extérieure.

5/ Coagulation par addition de thrombine

Cette réaction a été très étudiée. Nous avons quelquefois utilisé les résultats d'auteurs antérieurs, le plus souvent vérifié l'action des facteurs qu'il nous était indispensable de connaître pour le travail que nous avons fait. Nous croyons donc pouvoir renvoyer au chapitre suivant l'exposé de cette réaction.

Lorsque le fibrinogène ou la fibrine sont isolés et convenable-

ment lavés, leur dosage peut être fait par plusieurs voies: mesure de l'absorption dans l'ultra-violet (280 $m\mu$) Jacobson - mesure des fonctions phénol = Baserga et Nicole, mais surtout pesée, dosage d'azote, réaction du biuret.

La pesée de la fibrine est certainement le meilleur de ces modes d'évaluation, à condition de peser un poids suffisant d'une fibrine convenablement desséchée. Une correction s'impose, soit un calcul si le sang a été recueilli avec addition d'une solution de citrate, soit une calcination si l'on a préféré l'oxalate qui surcharge le pâton en oxalate de calcium. Mais le défaut de la pesée est surtout d'exiger un prélèvement de sang assez important. Un cm^3 de plasma, soit pratiquement 2 cm^3 de sang, ne contient que 4 mg de fibrinogène!

Doser l'azote du pâton de fibrine est une opération classique, facile et très précise, mais il ne semble pas qu'un accord soit fait entre les auteurs sur la quantité exacte d'azote que renferme ce protide. C'est pourquoi nous croyons pouvoir apporter notre contribution à ce problème et proposer, nous aussi, un facteur de multiplication: 6,33.

Reste, enfin, le dosage colorimétrique ou moyen de la réaction du biuret.

Lorsqu'à une solution de protides, on ajoute une solution d'un sel cuivrique et une assez forte quantité de soude, il apparaît, dans ce milieu bleu, une coloration violet pourpre, caractéristique des liaisons peptidiques. Cette réaction est si facile à obtenir que l'on a pensé l'utiliser quantitativement pour le dosage des protéines. Mais de nombreux écueils se sont présentés et pendant longtemps les dosages fondés sur la réaction du biuret n'ont pas donné satisfaction. Ce réactif était d'abord

conservé en deux solutions, l'une cuivrique, l'autre alcaline. Par addition de ces réactifs, se produisait un précipité d'hydroxyde qui, à certaines concentrations, pouvait retenir des protides, comme l'ont montré H.W. Robinson et C. Hogden. L'emploi d'un composé possédant au moins deux fonctions alcool contigues -tartrate, éthylèneglycol, glycérol- permit d'éviter cet inconvénient mais il fallut attendre les travaux de Gornall pour avoir une formule de réactif qui soit stable et dans laquelle les quantités de tartrate et de cuivre étaient fixées entre elles pour obtenir une coloration pourpre qui, après s'être développée, reste constante.

Le réactif longtemps classique de Weichselbaum avait l'inconvénient d'être trop riche en cuivre, de sorte que le dosage revenait à apprécier l'intensité d'une faible coloration pourpre dans un milieu trop bleu. Gornall a montré qu'il était nécessaire d'avoir une concentration en cuivre suffisante pour que ce métal soit en excès par rapport aux protides à doser mais qu'une concentration aussi grande n'était pas nécessaire. Selon J.W. Mehl, E. Pacovoka et R.J. Winzler, il faut un atome de cuivre pour quatre atômes d'azote protéique. Aussi le réactif de Gornall ne contient-il de cuivre qu'à une faible concentration.

Ce dernier réactif présente également l'avantage de donner avec les protides des solutions claires; souvent, autrefois, un précipité apparaissait assez rapidement au cours de l'analyse du plasma: une heure d'après l'étude de J.W. Mehl.

P. Fleury et Melle Eberhard ont repris les travaux de Gornall et les ont confirmés. Il leur était alors possible d'utiliser la réac-

tion du biuret en biochimie clinique sans craindre les critiques souvent fondées que l'on a pu faire à cette méthode.

C'est ce réactif que nous avons utilisé au cours de notre travail.

Chapitre Second

APPLICATION DE LA REACTION DU BIURET AU DOSAGE DU FIBRINOGENE PLASMATIQUE

Le but du travail que nous nous sommes proposé, était de mettre au point une technique de dosage à la fois rapide, sûre et exacte, dans laquelle le résultat serait obtenu au moyen de la réaction du biuret. Cette réaction, séduisante par sa simplicité, est, comme nous l'avons vu, sujette à nombreuses discussions mais les études successives de Gornall et de ses Collaborateurs au Canada, et de P. Fleury et Melle Eberhard en France, nous apportaient un instrument d'une grande fidélité.

Après avoir, dans un travail préliminaire, vérifié les conditions dans lesquelles cette réaction peut s'appliquer au dosage du fibrinogène ou de la fibrine, nous avons cherché à fixer notre choix, pour chaque temps du dosage, sur un mode opératoire qui nous parût convenable; à la fin de ce chapitre, nous décrirons avec soin, et dans le style propre aux Fiches Techniques de Mr. le Professeur Fleury, la technique que nous proposons.

o o o

I/ Application de la réaction du biuret au dosage du fibrinogène ou de la fibrine.

Nous avons utilisé, au début de ce travail, la technique de Lian et de Sassier, comme technique de référence. C'est sur elle que nous nous sommes fondés pour construire la courbe qui relie l'absorption lue au photomètre et la teneur en fibrinogène et pour comparer ces divers résultats avec les dosages d'azote.

Pour un même échantillon de plasma, nous avons fait deux prises d'essai: dans l'une, la fibrinémie était dosée selon la technique de

Lian et Sassier, par coagulation calcique et pesée. Le pâton desséché et pesé était, en outre, minéralisé selon la technique classique de Kjeldahl et l'ammoniaque formée titrée par une solution d'acide sulfurique après entraînement à la vapeur d'eau. Une autre prise d'essai était traitée par la même solution calcique et le coagulum lavé était redissous dans une solution normale de soude. Cette solution alcaline servait alors à faire une gamme, par dilutions convenables. A chaque tube de la gamme, nous avons ajouté 4 volumes de réactif du biuret, laissé une demi-heure à la température du laboratoire et mesuré l'absorption, soit à l'aide d'un photomètre monocellulaire de Rouy soit à l'aide d'un photomètre bicellulaire de Bonet-Maury.

Tous ces essais ont été faits sur plasmas de cheval, de mouton ou de boeuf et nous avons vérifié, après avoir obtenu des résultats qui nous ont paru satisfaisants, que les plasmas humains normaux se comportaient de la même façon.

Les courbes que nous avons obtenues de cette façon, sont tout à fait régulières et superposables d'une expérience à l'autre. Elles sont donc indépendantes de l'origine du fibrinogène. De plus, nous avons constaté qu'il était possible de remplacer ces courbes par celles qu'on peut obtenir à partir des protéines du sérum selon la technique qui a été indiquée par P. Fleury et Melle R. Eberhard et qui est décrite dans les fiches techniques de P. Fleury.

Ces expériences ont eu, en outre, l'intérêt d'apporter notre contribution à l'établissement du facteur de multiplication azote-protéine dans le cas de la fibrine. En moyenne, 6,33 g de fibrine contiennent 1 g. d'azote, ce qui revient à dire que 100 g. de fibrine

contiennent 15,79 g. d'azote.

Peters et Van Slyke indiquent 6,25 g., valeur classiquement admise pour les protéines; E. Brand, B. Kassell et L.J. Saidel, au contraire, admettent 5,90.

II/ Isolement du fibrinogène ou de la fibrine

La réaction du biuret est très sensible, beaucoup plus que ne le sont les dosages gravimétriques. Grâce à cette sensibilité, nous pouvions exiger du mode opératoire que nous souhaitions proposer, qu'il ne demande qu'un prélèvement de sang minime. Nous y voyions plusieurs avantages: notre technique devrait être applicable aux enfants, de préférence aux techniques gravimétriques. En outre, la fibrinémie constitue l'une des réactions dites non spécifiques des protéides.

Ces examens d'abord réservés à l'exploration fonctionnelle du foie, ont vu leur domaine s'étendre sensiblement. Faisant exception au titre, la fibrinémie est le seul dosage spécifique de cette série. Or, le biologiste a toujours intérêt, lorsqu'il doit pratiquer de nombreuses réactions ou dosages sur un même sujet, à réduire au maximum le volume du sang prélevé. Aussi avons-nous d'abord cherché quel était le plus petit volume de plasma pour lequel la technique de Sassier était encore valable.

1. Choix de la prise d'essai

Nous avons donc comparé à la technique de Sassier utilisant 5 cm³ de plasma, un mode opératoire fondé sur la coagulation calcique de la fibrine et l'évaluation colorimétrique de celle-ci, en faisant

varier la prise d'essai. Le tableau n° I montre qu'avec 0,5 cm³ de plasma, les résultats sont toujours valables et qu'avec 0,2 cm³, ils le sont souvent. Nous avons donc choisi 0,5 cm³ comme volume du plasma dans la technique que nous proposons; mais, au besoin, on pourra toujoursⁿutiliser que 0,2 cm³ de plasma et obtenir encore un résultat valable pour la clinique, tant les variations pathologiques de la fibrinémie sont importantes.

Tableau N° 1

: Technique:	:	:	:	:
: de	:	: Coagulation calcique et biuret	:	:
: Sassier	:	:	:	:
: sur 5cm ³	:	: sur 1cm ³ : s/0,5 cm ³ : s/ 0,2 cm ³	:	:
:	:	:	:	:
: 7,5	:	: 7,4	:	: 8,0
: 7,5	:	: 7,4	:	: 8,0
: 7,5	:	: 7,5	:	: 7,5
: 5,1	:	: 5,0	:	: 6,0
: 2,6	:	: 2,2	:	: 2,0
: 2,6	:	: 2,2	:	: 2,3
: 1,7	:	: 1,6	:	: 1,7
:	:	:	:	:

Résultats exprimés en g de fibrinogène par L de plasma, obtenus par la méthode au biuret avec des prises d'essai de divers volumes, comparés à ceux que donne la méthode de Sassier.

2. Choix d'une technique d'isolement du fibrinogène ou de la fibrine

A. Essai d'isolement du fibrinogène par relargage

Lorsque l'on mélange à un plasma des solutions salines convenablement choisies de telle façon que la concentration du milieu en sels soit bien déterminée, il se sépare une fraction plus ou moins importante des protéines plasmatiques. Telle qu'on peut l'isoler par

filtration ou par centrifugation et éventuellement la doser. P. Fleury et Melle Eberhard ont ainsi proposé une technique de séparation et de dosage des globulines au moyen du sulfate d'ammonium et nous aurions aimé utiliser ce même sel dans des conditions analogues pour que le dosage du fibrinogène puisse être fait parallèlement à celui des globulines.

Nous avons donc relargué le fibrinogène dans une solution de sulfate d'ammonium à 25 pour cent de la saturation, puis nous l'avons séparé par centrifugation et terminé le dosage par le biuret selon la technique décrite par P. Fleury et Melle Eberhard, pour les globulines. A partir du même plasma, nous avons dosé le fibrinogène par coagulation calcique et réaction du biuret. Nous avons ainsi pu vérifier les remarques qu'avaient précédemment faites J. Badin et Melle G. Boussier.

Les protides relargués ne sont pas constitués par le seul fibrinogène, mais celui-ci entraîne avec lui d'autres composés biurétogènes, de telle sorte que les résultats obtenus sont toujours trop élevés ; nous avons trouvé, par exemple, 4,50 g/l pour 4,35 - I,82 pour 1,55, etc...

Nous avons alors pensé à purifier le précipité obtenu par redissolution dans la solution physiologique de chlorure de sodium à 9 pour mille et coagulation par addition de thrombine, mais ces essais ont échoué parce qu'une partie des protides relargués étant dénaturée ne se redissolvait pas convenablement dans le soluté physiologique. En outre, cette façon de faire n'apportait aucun avantage, puisqu'il était toujours possible d'obtenir le coagulum directement à partir du plasma.

Lorsque P. Pignard, dans une communication personnelle, nous eût parlé d'une technique qu'il avait mise au point par l'établissement du rapport sérique des albumines aux globulines en substituant au sulfate d'ammonium le sulfate de lithium, nous fîmes de nouveau quelques essais avec ce nouveau sel.

Nous avons, à ce moment, mis au point le mode opératoire que nous proposons à la suite de ce travail et c'est à ce mode opératoire que nous avons comparé le relargage au sulfate de lithium. Nous avons utilisé une solution de sulfate de lithium, saturée à 0°, que nous avons ajouté à volumes variables à des dilutions de plasma et l'eau distillée. Nous avons déduit de ces expériences que la concentration du milieu en sulfate de lithium pour obtenir la précipitation de composés biurétogènes en quantité égale à celle que donne la thrombine, était de 36 pour cent de la saturation à 0°. Nous n'avons pas poussé très loin l'étude de ce relargage, car, de toutes façons, il ne pouvait pas donner naissance à un mode opératoire aussi simple que celui qui utilise la thrombine et que nous décrivons plus loin.

B. Essai d'isolement de la fibrine par coagulation calcique

Nous avons pris comme base pour cette partie de notre travail, la technique de Sassier. L'un des inconvénients de cette technique est la durée assez longue (trois heures) pendant laquelle il faut laisser s'opérer la coagulation de la fibrine. En effet, cette obligation empêche d'obtenir rapidement le résultat du dosage. En outre, il arrive que l'on observe une désagrégation puis une redissolution au moins partielle du coagulum lorsqu'on laisse celui-ci dans son milieu de formation

plus de trois heures. On est alors en droit de se demander si ce processus de fibrinolyse ne se produit pas avant ce temps, assez peu pour qu'il ne soit pas décelable à l'oeil, mais assez cependant pour qu'il conduise à une erreur par défaut dans le résultat obtenu. Nous avons donc essayé de raccourcir le temps de coagulation du plasma par addition de divers adjuvants.

1/ Addition de sérum frais

On sait que, des différents facteurs qui interviennent dans la coagulation, certains sont utilisés en totalité ou en partie alors que d'autres se retrouvent dans le sérum comme ils étaient dans le plasma. Sans vouloir préjuger de la nature des facteurs possibles du sérum, nous avons voulu savoir si l'addition de sérum frais ne répondrait pas au but que nous nous étions proposé. Nous devions donc, au cours d'une même expérience, vérifier si cet adjuvant raccourcissait le temps de coagulation et ce que devenait, en sa présence, la concentration en fibrinogène trouvée.

Dans une série de tubes à centrifuger cylindro-coniques, nous avons donc introduit successivement 20 cm³ de solution coagulante selon Sassier, portée à 37°, 1 cm³ de plasma et des quantités variables d'un sérum et nous avons laissé ces tubes à 37°. Le dosage était fait par photométrie.

L'expérience nous a montré qu'il ne nous était pas possible d'apprécier le temps de coagulation d'un tel système en recherchant la présence d'un caillot à l'aide d'un agitateur. En effet, dans un tel milieu, le caillot se forme plus lentement et plus mal. Lorsque le caillot se forme dans un milieu que l'on ne trouble pas, il n'est

pas partout collé aux parois du tube et l'on peut le voir, en certains points, flotter dans la solution coagulante. C'est simplement l'apparition de ce phénomène que nous avons noté. Nous savons fort bien qu'il ne s'agit là que d'une appréciation et que les valeurs que nous donnons ne sont que relatives, qu'un autre manipulateur aurait sans doute apprécié les faits autrement. Mais ce qui compte, c'est uniquement la comparaison entre les valeurs obtenues par un même expérimentateur; c'est d'ailleurs ce qui se passerait pour le dosage de la prothrombine plasmatique, si les biologistes exercés n'apprenaient pas à voir aux nouveaux.

Nous avons d'abord confirmé le fait que le poids de fibrine formée augmente progressivement avec le temps et que le caillot n'a pas son poids maximum.

Dans une expérience comportant une série de dosages de fibrine dans le sang de cheval qui ne diffèrent que par la durée de la coagulation, nous constatons que le caillot récolté dès sa formation pesait 3,25mg, celui recueilli au bout de 10 m. 3,45 mg et au bout de deux heures, 3,50 mg. Dans une autre expérience, on trouve pour les récoltes successives: à la formation 4,25 mg, après 2 heures 4,50 mg et au bout de 4 heures, 4,70 mg.

Toutes nos expériences avec addition de sérum étant superposables, nous n'en décrivons que deux (Tableau n°2)

Tableau N° 2

: Sérum ajouté en cm ³ :	0 :	0,2 :	0,4 :	0,6 :	0,8 :	1 :
: Temps de coagulation :	:	:	:	:	:	:
: en mn :	105 :	55 :	45 :	45 :	45 :	45 :
: Poids de fibrine du :	:	:	:	:	:	:
: caillot dès sa forma- :	:	:	:	:	:	:
: tion en mg. :	7,1 :	7,5 :	7,7 :	7,9 :	8,3 :	8,6 :
: Temps de coagulation :	190 :	75 :	55 :	50 :	45 :	40 :
: Poids de fibrine du :	:	:	:	:	:	:
: caillot dès sa forma- :	:	:	:	:	:	:
: tion en mg. :	6,25 :	6,5 :	6,75 :	7,0 :	7,0 :	7,0 :

Influence de l'addition de sérum frais sur le temps d'apparition de la fibrine et le poids de celle-ci au moment où elle apparaît.

Les résultats sont donc significatifs; nous avons utilisé des plasmas frais (notre premier exemple) ou conservés (12 jours pour le second exemple), des sérums frais ou conservés, mais toujours nous avons obtenu des résultats du même ordre. En fait, dans le cas du plasma frais, seul intéressant en biologie clinique, le gain de temps possible ne nous a pas paru suffisant et nous avons abandonné ces essais.

2/ Addition de phénol

On a remarqué qu'en présence de phénols, le temps de formation du caillot de fibrine était diminué. Nous avons contrôlé ce fait en utilisant des concentrations de 0,3 à 0,5 de phénol ou d'o-crésol pour cent de solution coagulante. Cette addition est très intéressante. C'est

ainsi qu'un plasma donnant en 30 m. un coagulum contenant 4,40 mg de fibrine et après 6 heures, 5,0 mg, laisse apparaître dès 20 minutes, en présence de 0,4 pour cent de phénol, un caillot contenant directement et définitivement 5,1 mg de fibrine.

Mais ce qui nous a paru le plus curieux au cours des essais que nous avons faits, c'est que les phénols accélèrent les phénomènes de fibrinolyse dans le cas des plasmas conservés coagulés par apport de thrombine.

Dans un plasma de boeuf conservé 20 jours et donnant naissance par cm³ à 4,75 mg de fibrine après 6 heures, l'addition de 1 mg. de thrombine et de 0,4 pour cent de phénol produit, dès la coagulation, 4,75 mg, une heure plus tard 5,40 mg, enfin 3 heures plus tard 4,0 mg de fibrine. Nous avons obtenu ce résultat plusieurs fois, tant avec le phénol qu'avec l'o-crésol.

3/ Addition de Thrombase

L'addition de thrombine (Thrombase Roussel) à la solution coagulante raccourcit notablement le temps de coagulation du plasma et donne rapidement le plus grands poids de fibrine possible. Nous avons pensé étudier l'action de la thrombine sur la coagulation calcique. Nous avons dû, assez vite, modifier notre point de vue et ce que nous avons été amenés à étudier, au contraire, c'est l'influence des sels de calcium sur la coagulation par la thrombine. Aussi, devons-nous maintenant nous intéresser à ce mode de coagulation.

C. Isolement de la fibrine par formation du caillot au moyen de thrombine.

Trois problèmes se posaient d'abord à nous: le gain de temps

apporté par la thrombine était-il intéressant pour le but que nous nous proposons? Les résultats des analyses faites au moyen de ce facteur étaient-ils semblables ou différents de ceux que l'on peut obtenir par la technique de Sassier? Quelle quantité de thrombine devons-nous mettre en oeuvre ?

1/ Temps de coagulation

La coagulation par addition d'une préparation de thrombine d'un plasma décalcifié. Elle se produit en quelques minutes et est toujours totale en 10 m lorsqu'on emploie un excès de thrombine, comme nous le proposons dans la technique que nous décrivons page 27. Un mg. de ce facteur donne encore un caillot en un quart d'heure lorsqu'on l'ajoute à 0,5 cm³ de plasma.

2/ Quantité de fibrine coagulée

D'une façon constante, les résultats obtenus par coagulation calcique et au moyen de la thrombine ont été concordants. Par exemple: en g/l 2,81 et 2,84 - 4,63 et 4,55. La coagulation totale, c'est-à-dire le poids maximum en fibrine, a été obtenu quelquefois, quelques minutes après l'apparition du caillot mais le plus souvent dès ce moment même.

3/ Quantité de thrombine à mettre en oeuvre

Cette quantité varie avec les expériences que nous avons faites. Souvent faible avec les plasmas frais (de l'ordre de 2 mg pour 0,5 cm³ de plasma), elle est plus importante avec les plasmas conservés (4 à 10 mg). Dans le mode opératoire que nous proposons, nous

utilisons une assez grande quantité de ce réactif, pour être sûr d'en ajouter suffisamment.

4/ Influence des ions calcium

Des résultats discordants obtenus au début de notre expérimentation et dus à ce que nous étudions alors plutôt l'influence de la thrombine sur la coagulation par recalcification que l'influence des ions calcium en présence de thrombine, nous ont conduit à entreprendre une large série d'expériences sur ce sujet.

De nombreux auteurs, Owren, Mommaerts, Astrup, Crut, cités par M. Leroux, R. Prugnaud et P. Frigot, ont noté que le temps de coagulation d'un plasma ^(T) est inversement proportionnel à la concentration de la thrombine présente ^(c) et proportionnel à la force ionique du milieu ^(k), et l'on a $T = K \frac{1}{c}$ (Relation de Quick). Autrement dit, la présence d'ions calcium dans le milieu où l'on veut produire la coagulation par la thrombine, est nuisible. Le tableau n° 3 montre que nous avons bien retrouvé cette action inhibitrice des ions calcium. Nous avons utilisé une solution de chlorure de calcium dont nous avons prélevé des quantités croissantes pour un volume total de 10,5 cm³, plasma (0,5 cm³) compris. Le temps de coagulation a été évalué, comme nous l'avons dit page 15. Dans les essais où la concentration en sel de calcium était la plus grande (0,16 M et 0,2 M), nous n'avons pas obtenu un coagulum semblable à ceux que l'on obtient d'ordinaire mais il est apparu dans un milieu demeuré liquide, des fils de fibrine isolés.

Le dosage de la fibrine obtenu dans ces essais montre que les sels calciques ont également une influence défavorable sur la quantité

de fibrine formée et que cette quantité s'abaisse régulièrement lorsque l'on passe des solutions sans calcium aux solutions 0,2M.

Tableau n° 3

: Concentration :	:	:	:	:	:	:	:	:	:
: en Cl ₂ Ca :	0	:0,04M:	0,06M:	0,08M:	0,10M:	0,14M:	0,16M:	0,20M	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
: Temps de coa- :	:	:	:	:	:	:	:	:	:
: gulation :	1m.30:	1m.15:	1m.30:	3m	10m	10m	-	-	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
: Poids de fi- :	:	:	:	:	:	:	:	:	:
: brine formée :	:	:	:	:	:	:	:	:	:
: en mg. :	2,3	2,3	2,2	2,1	1,9	1,3	1,0	0,7	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:

Influence des ions calcium sur la formation de fibrine à 37° dans un milieu contenant, pour 10,5 Cm³, 0,5 Cm³ de plasma et 10 mg. de thrombine.

Le phénomène est plus complexe lorsque la thrombine se trouve dans le milieu à des doses plus faibles. Lorsqu'en effet, la quantité de thrombine ajoutée est insuffisante pour produire à elle seule la coagulation totale, dans les conditions opératoires où nous nous plaçons, les ions calcium en assurant la transformation de la prothrombine en thrombine, favorisent la formation de fibrine, au moins dans une certaine mesure. Tout se passe comme si thrombine et calcium (c'est-à-dire thrombine exogène et thrombine néo formée du plasma) concourraient, chacun pour son compte, à la réaction.

Tableau N° 4

: Concentration en :	:	:	:	:	:	:
: Cl ₂ Ca :	0	:0,01M:	0,02M	: 0,04M :	0,08M	:
:	:	:	:	:	:	:
: Poids de fibrine :	:	:	:	:	:	:
: formée en mg. :	3,70	3,95	4,0	4,1	4,2	:
:	:	:	:	:	:	:

Ce tableau n° 4 indique l'influence des petites quantités d'ions calcium sur la formation de fibrine après addition d'une quantité insuffisante de thrombine. Pour 10,5 Cm³, 0,5 Cm³ de plasma et 5mg de thrombine.

Mais là également, un excès d'ions calcium a une influence très défavorable. Dans l'essai faisant l'objet du tableau n° 4, une concentration en chlorure de calcium de 0,2 M ne donne plus que 2,60 mg de fibrine.

Dans la technique que nous proposons, nous utilisons donc un excès de thrombine et n'introduisons pas d'ions calcium dans le milieu.

5/ Influence du pH

La formation de fibrine résultant d'une réaction de caractère enzymatique, il est très normal qu'elle soit soumise à l'influence du pH du milieu où elle se produit. M. Leroux et ses collaborateurs fixent le pH à 7,3 au moyen du tampon de Michaëlis au véronal - véronal sodique mais ne justifient pas cette opération. En fait, il existe une assez grande marge de sécurité de part et d'autre de l'optimum et, dans nos expériences où les mesures ont été faites à l'électrode de verre, la coagulation s'est montrée semblable en durée et en quantité de fibrine formée de pH 6,5-6,7 à pH 7,4 -7,8. A pH 6,0 d'une part, 9,0 de l'autre, la coagulation ne se produit pas. Le mélange des réactifs et du plasma, sans addition de tampons, a un pH de l'ordre de 6,9. Il nous a donc paru inutile de fixer le pH avec une grande précision.

III - SEPARATION DE LA FIBRINE

Il est d'usage de séparer la fibrine formée à l'aide d'un carré de toile fine (fil, soie, nylon...). La masse gélatineuse obtenue laisse spontanément exsuder une partie du liquide qu'elle contient et par expression, on obtient un petit pâton qu'on peut facilement recueillir. Nous avons pu constater que cette séparation est encore facile lorsqu'il s'agit d'isoler 0,8 à 1 mg de fibrine. On peut encore le réussir, à condition d'opérer soigneusement, pour un demi-milligramme.

Nous avons tenté d'obtenir cette séparation par centrifugation, ce qui permettrait de faire tout le dosage dans un même récipient. L'expérience nous a montré que cette opération était tout à fait possible: le pâton se sépare très bien et les lavages sont très facilement réalisables. Les résultats suivants le montrent parfaitement. La plupart de ces examens comparatifs ont été faits 2 à 2 à partir d'un même échantillon. Certains cependant ont eu pour point de départ des dilutions inconnues de nous d'un même plasma et les résultats indiqués dans le tableau ont été obtenus par calcul lorsque nous avons connu les dilutions qui avaient été faites.

Tableau n° 5

:	:	:
:	Linge fin	: Centrifugation
:	:	:
:	:	:
:	1,1 mg	: 1,1 mg :
:	3,1	: 3,0 :
:	3,25	: 3,15 :
:	3,3	: 3,3 :
:	3,4	: 3,4 :
:	4,25	: 4,25 :
:	5,4	: 5,4 :
:	:	:

Séparation de la fibrine au moyen d'un linge fin ou par centrifugation:
Comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes.

Aussi avons-nous cru bon, comme mode de séparation de la fibrine, de proposer la centrifugation parce que cette technique constitue un procédé courant dans les laboratoires.

IV - MISE EN SOLUTION DE LA FIBRINE

Une fois la fibrine obtenue -et lavée- il faut la mettre en solution pour la doser ultérieurement par la réaction du biuret. Le plus simple est de la dissoudre dans une solution alcaline. Nous avons essayé la soude à un certain nombre de concentrations. La lessive de soude officinale ($d = 1,33$) dissout très mal la fibrine et quelquefois même ne la dissout pas du tout. Il est vraisemblable que ce réactif énergique provoque des transformations de la fibrine en surface qui s'opposent à la pénétration du réactif donc à la solubilisation de la fibrine. Lorsqu'on emploie les solutions alcalines diluées, de la normalité à 0,025 N, la dissolution est totale. Il est cependant nécessaire de s'aider assez longtemps de la chaleur dès 0,1 N (15 m. environ dans un bain d'eau à 70-80°).

La soude N/80 utilisée dans nos conditions opératoires (2 cm³ pour 3 à 4 mg de fibrine) n'a pu dissoudre que péniblement et partiellement ce protide, vraisemblablement parce qu'elle n'apportait pas une alcalinité suffisante pour la réaction chimique de dissolution.

Nous préconisons donc l'emploi d'une solution de soude normale ou demi-normale qui permet d'obtenir en quelques secondes en s'aidant de la chaleur au besoin, une dissolution totale et rapide.

On pourrait craindre que l'alcalinité de la solution influe sur la coloration obtenue lorsque l'on mélange le réactif du biuret

et la solution de fibrine. Nos essais nous ont montré, qu'en fait, elle n'avait aucune influence sur la lecture obtenue au moyen d'un appareil monocellulaire tel que le photomètre de Rouy, et que l'influence est très faible lorsque l'on utilise un photolorimètre bicellulaire très sensible comme celui de Bonet-Maury. Il suffit donc dans ce dernier cas de construire la courbe de référence en utilisant la même solution alcaline que celle que l'on a choisie pour le dosage.

Nous avons été tentés par d'autres modes de dissolution mais aucun ne nous a donné satisfaction. C'est ainsi que, d'après R.E.D. Clark, la fibrine obtenue par action de la thrombine sur le fibrinogène en solution est soluble dans les solutions concentrées d'urée. Mais nous n'avons pas pu dissoudre la fibrine obtenue à partir de plasmas dans ce réactif.

Nous avons par contre à froid dissous immédiatement la fibrine au moyen d'acide thioglycolique. Mais ce réactif réduit le complexe cuivrique présent dans le réactif du biuret et ne peut donc être utilisé ainsi. Par oxydation de cet acide à l'iode ou à l'eau oxygénée, la fibrine dissoute reste bien en solution, mais on ne peut non plus utiliser cette solution pour faire une réaction du biuret.

V - MODE OPERATOIRE PROPOSE

Le mode opératoire que nous proposons ci-dessous a été utilisé par un certain nombre d'expérimentateurs. C'est d'abord Melle Eberhard qui a bien voulu vérifier qu'il était réalisable et que les résultats obtenus étaient valables. Nous sommes heureux de la remercier ici de l'aide précieuse qu'elle nous a ainsi apportée.

Ce sont ensuite les étudiants du Certificat d'Etudes Supérieures

de Chimie Biologique appliquée, du Certificat d'Etudes spéciales ou Techniques de Biochimie, du Certificat d'Etudes Supérieures de Microbiologie, Hématologie, Sérologie et Parasitologie, et du Certificat d'Etudes Spéciales d'Hématologie, qui ont montré que cette technique était d'application facile pour des manipulateurs non spécialement avertis.

Nous croyons donc pouvoir proposer ce mode opératoire à la fois simple, rapide et précis.

MICROMETHODE DE DOSAGE DU FIBRINOGENE PLASMATIQUE

Principe - Le fibrinogène est transformé en fibrine au moyen de trombase. La fibrine est dissoute en milieu alcalin et dosée par la réaction du biuret.

Prélèvement - Le sang est recueilli dans un tube à centrifuger contenant quelques centigrammes d'oxalate ou un volume défini d'une solution citratée (comme pour le dosage de la prothrombine qui d'ailleurs peut être fait sur le même prélèvement). Le sang ne doit pas être recueilli sur héparine.

Réactifs - 1 - Solution coagulante

Thrombase (Roussel) 0,22 g

Solution aqueuse de chlorure
de sodium à 9/1000 .. 50 cm³

2 - Solution aqueuse de chlorure de sodium à 9/1000

3 - Solution normale de soude

4 - Réactif du Biuret selon Gornall.

Mode opératoire -

Dans un tube à centrifuger conique, placez 10 cm³ de la solution coagulante R1 et portez à 37°. Au bout de quelques minutes, ajoutez 0,5 cm³ de plasma.

Agitez. Laissez à l'étuve à 37°, 5 minutes au moins, 10 au plus.

Remuez le tube pour mettre en suspension le voile de fibrine.

Ajoutez, en agitant doucement, 5 à 8 cm³ de solution aqueuse de chlorure de sodium à 9/1000 en versant le long des parois pour éviter la formation de bulles d'air, et centrifugez pendant 10 mn à 5000-6000 tours par minute. Décantez. Lavez la fibrine au moyen de 1 ou 2 cm³ de solution chlorurée R2. Ajoutez 1 cm³ de soude normale et faites dissoudre au bain-marie à 60-70° (ce qui peut demander 5 minutes).

Refroidissez aux environs de 20-25° en plaçant le tube dans l'eau froide; ajoutez 4 cm³ de réactif du Biuret, laissez une demi-heure à 20-25° et terminez le dosage à l'électrophotomètre en utilisant comme témoin une solution obtenue par mélange de 1 cm³ de soude normale et de 4 cm³ de réactif du Biuret.

Reportez-vous à la courbe utilisée pour le dosage des protides sériques (P. Fleury. Fiches Techniques . Généralités.8).

Si vous avez recueilli le sang sur citrate, tenez compte de la dilution due à ce réactif.

CHAPITRE IV

LE FIBRINOGENE CHEZ LES MAMMIFERES

La technique que nous proposons est utilisée dans un certain nombre de laboratoires de biochimie des Hôpitaux de Paris, où sont analysés des plasmas humains. Nous avons voulu profiter de cet instrument pour examiner quelques plasmas de Mammifères. Nous tenons ici même à remercier Monsieur le Docteur Nouvel qui nous a très aimablement donné quelques centimètres cubes de sang d'animaux, représentants de groupes zoologiques intéressants. Le tableau n° 6 rassemble nos résultats.

Tableau n° 6

<u>RONGEURS</u>	
Cobayes: Cavia cobaya Marcq Caviidès.....	4,2 g/l
<u>ONGULES PERISSODACTYLES</u>	
Cheval : Equus Cabollus L. Equidés	5,5 g/l
<u>ONGULES ARTIODACTYLES</u>	
Porc : Sus Scrofa L. Suidés	3,0 g/l
Boeuf : Bos Taurus L. Bovinés	3,75g/l
Bouc nain: Capraibox L. Caprinés	5,5 g/l
Mouton : Ovis Ariès L. Ovinés	4,0 g/l
Lama : Lama glama glama L. Camélidés	4,0 g/l
<u>PRIMATES</u>	
Cynocéphale: Papio papio cynocephalus L.Papiidès..	3,3 g/l

Tenour en fibrinogène du plasma de divers Mammifères

Lorsque ces résultats représentent la moyenne de plusieurs analyses faites sur plusieurs plasmas, ce qui est le cas pour les animaux de boucherie, on peut les tenir pour valables. Les variations autour de la moyenne sont cependant assez faibles; aussi, par analogie,

pensons-nous que les résultats obtenus par l'analyse d'un seul plasma ont de grandes chances de refléter la réalité.

Nous en déduisons que la concentration en fibrinogène du plasma des Mammifères est très voisine pour chacun d'eux et qu'elle se situe entre 3 et 6 g/l.

2^{me} P A R T I E

APPLICATION DE LA REACTION DU BIURET

AU DOSAGE DES HOLOPROTEINES DU LAIT DE VACHE.

Chapitre I

APPLICATION DE LA REACTION DU BIURET AU DOSAGE DES HOLOPROTEINES DU LAIT DE VACHE

La réaction du biuret, par sa simplicité, permet de faire des dosages de protides dans de nombreux milieux. P. Fleury et Melle R. Eberhard ont publié récemment (1953) une technique de dosage de la caséine du lait de vache qui allie l'élégance et la précision à la rapidité. Or, on sait que la caséine n'est pas la seule protéine du lait. Aussi avons-nous eu pour intention de doser ces autres protéines en appliquant cette réaction. Notre étude n'a porté que sur le lait de vache car la composition des différents laits est beaucoup trop variable. Les protides totaux vont de 12 g/l (lait de femme) à 62 g/l (lait de Renarde) et leur comportement dans une même réaction est trop différent pour qu'il soit possible de passer de l'un à l'autre sans étude préalable.

La nature des diverses protéines que l'on rencontre dans le lactosérum de vache a fait l'objet d'un certain nombre de travaux dont les conclusions, bien élémentaires et souvent assez confuses, ne doivent pas être perdues de vue lors d'un travail d'analyse. La présence de ces composés est facilement mise en évidence par tout un faisceau de réactions (coagulation à la chaleur, précipitations, réactions colorées du biuret, xanthoprotéique, de Millon...) dont certaines ont été utilisées ou peuvent l'être quantitativement. Mais certaines de ces réactions, et c'est le cas pour la réaction du biuret, sont positives non seulement avec les protéines mais même des substances non coagulables, des peptones aux polypeptides, et que l'on trouve normalement dans le lait.

Les protéines elles-mêmes ne sont pas toutes bien définies et

l'application à leur cas des réactions classiques qui servent à l'étude des protéines sanguines ne donne pas de résultats aussi nets. L'emploi du sulfate d'ammonium à demi-saturation, sépare bien deux fractions que l'on nomme, par analogie avec le sang, lactalbumine (soluble) et lactoglobuline (insoluble).

On ne sait que peu de choses de la lactoglobuline (qu'il ne faut pas confondre avec la β -lactoglobuline dont nous allons parler) présente normalement dans le lait de vache à la concentration de 0,05 à 2 g/l, si ce n'est son insolubilité à la fois dans l'eau et dans les solutions demi-saturées de sulfate d'ammonium; il s'agit donc bien d'une globuline.

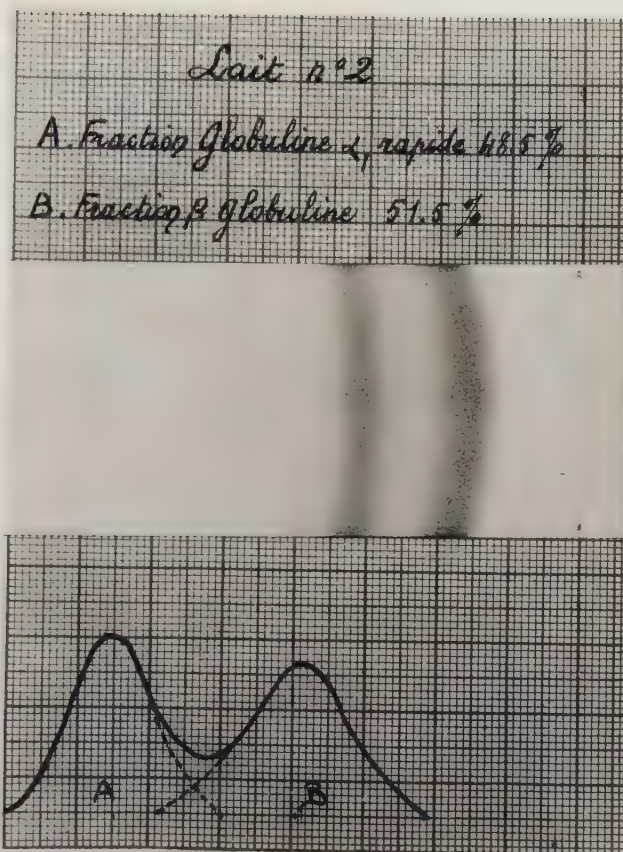
Au contraire, la lactalbumine est une fraction complexe. Son hétérogénéité a été démontrée par les mesures de masse moléculaire, la cristallisation d'un constituant, l'ultracentrifugation et l'électrophorèse. Mais, fait curieux, la fraction cristallisable est insoluble dans l'eau; il s'agit donc là encore d'une globuline, la β -lactoglobuline. Cette β -lactoglobuline est la seule protéine nettement définie de lactosérum qui en contient 1,5 à 1,8 g/l. L'autre constituant de la "lactalbumine" présente au contraire les réactions des albumines; il n'a cependant jamais été obtenu à l'état de pureté et son étude est très insuffisante. Il représente 1,2 à 1,5 g/l.

Ces trois constituants protidiques sont classiquement séparés par la longue technique de Palmer: relargage de la lactoglobuline par le sulfate d'ammonium demi-saturé ou le sulfate de sodium à 18 g/100 cm³, puis la lactalbumine par addition d'une nouvelle quantité de sel neutre, solution du précipité dans l'eau et dialyse qui sépare la β -lactoglobu -

line insoluble dans l'eau. R. Perceau a publié en 1950 une excellente mise au point de cette difficile question; nous l'avons beaucoup utilisé pour ce qui précède. Nous avons cherché si à l'électrophorèse, nous obtenions bien trace de l'existence de ces constituants. Nous avons pu réaliser cette expérience grâce à l'extrême obligeance de Monsieur Girard, pharmacien chef de l'Hôpital Lariboisière et de son Chef de laboratoire, Mademoiselle Paulhiès, à qui nous sommes heureux d'exprimer ici toute notre gratitude.

Nous avons concentré le lactosérum par dialyse sur subtosan et utilisé l'appareil à électrophorèse Elphor, en suivant le mode opératoire utilisé pour l'analyse des protides sanguins. Nous avons ainsi mis en évidence deux protides bien séparés, l'un d'eux migrant comme une globuline α_1 rapide, l'autre comme une globuline β . Ces deux protéines se trouvent dans le lait à des concentrations très voisines, avec cependant une légère prédominance de la globuline β (51,5 et 55 pour cent dans deux expériences).

Quelques auteurs ont précédemment utilisé l'électrophorèse pour éclairer ce problème. R. Perceau qui en fait état, indique que leurs résultats sont peu concluants. Il n'est pas prouvé, en effet, que les fractions que sépare l'électrophorèse, et dont le nombre varie avec le pH auquel l'expérience est conduite, représentent des protides différents.



L'électrophorèse sur papier a été pratiquée avant nous par J.E. Vandegaer et J.K. Miettinen. Ils ont opéré sur le lactosérum (obtenu par précipitation de la caséine à pH 4,6), dialysé et lyophilisé. Ils retrouvent les 5 ou 6 constituants observés par les trois expérimentateurs précédents qui avaient opéré avec la méthode de Tiselius; sur ces 5 ou 6 constituants, 2 ou 3 sont en quantité très faible et ne se distinguent bien que sur le lait cru. Avec le lait pasteurisé, il existe deux bandes très fortes et 1 ou 2 plus faibles, avec le lait stérilisé, une seule bande très large.

Si l'on remarque que nous avons opéré sur des solutions nettement plus diluées que celles des auteurs précédents et sur un lait pasteurisé, on comprend fort bien que nos protéinogrammes ne manifestent

tent que les deux bandes les plus importantes (globuline α_1 rapide et globuline β).

A côté de ces constituants, il existe dans le lait de vache d'autres composés azotés tels que des acides aminés, l'urée, l'acide urique, la créatinine, l'ammoniaque... et l'on conçoit que la valeur des résultats analytiques, ainsi que leur interprétation, dépendent directement de la spécificité des techniques de séparation des composés à doser et de la spécificité des réactions utilisées pour faire les mesures.

Ce qui nous a le plus surpris, c'est que parmi les méthodes de dosage proposées jusqu'ici, beaucoup sont des méthodes par différence, c'est-à-dire que l'inexactitude de l'un des résultats se reporte sur tous ceux qui en découlent.

Par exemple, G.M. Moir dose les protéines totales après précipitation trichloracétique, l'ensemble caséine-globulines par relargage au sulfate de magnésium ou au sulfate de sodium et la caséine par précipitation à pH 4,6. Or, on sait que la β lactoglobuline n'est pas relarguée par les concentrations en sels neutres classiques pour le sang et nous verrons que l'acide trichloracétique conduit toujours à des résultats trop élevés.

Les réactions communes aux différents protides qui sont uti-

lisées pour des déterminations quantitatives exigent pour chaque protide, le plus souvent, un coefficient particulier.

Dans le cas de la formol-titration, le coefficient qui permet de transformer la lecture de burette en poids de protéine varie de 1,98 à 2,10 selon la nature du protide en jeu (L.Karumine et M. Shilovich). Ces holoprotéines contiennent 15,4 pour cent d'azote, la caséine 15,65. Nous-mêmes avons noté que la courbe d'étalonnage des photomètres pour la réaction du biuret n'était pas la même pour la caséine et pour les holoprotéines.

Ces dosages de groupes de protéines sont donc très difficiles à réaliser, comme le font remarquer B.C. Johnson et A.M. Swanson; ils ne donnent qu'une approximation plus ou moins exacte dont la précision est fonction à la fois du facteur mathématique choisi et de la constance de composition relative des laits. Si, par exemple, pour les différents laits, le rapport des holoprotéines à la caséine est constant, il sera toujours possible d'utiliser valablement une technique déterminée, mais si ce rapport varie, les résultats obtenus perdent beaucoup de leur signification.

C'est cependant un dosage de ce type qui, proposé par K.M. Shahani et H.H. Sommer, permet d'évaluer assez simplement chaque groupe de composés azotés du lait de vache. Nous le décrivons rapidement pour montrer dans quelle voie se sont surtout engagé les analystes. Tous ces dosages se ramènent à des dosages d'azote: azote total du lait (a), azote total du lactosérum, obtenu par addition d'acide acétique à pH 4,6 (b) - azote des globulines, séparées du lactosérum par le méthanol à 26° à froid (c) - azote des composés non coagulables

par la chaleur (d) - azote des composés non précipitables par l'acide trichloracétique (e). On a ainsi :

Caséine	=	a - b
"Albumine"	=	b - (c+d)
"Globuline"	=	c
Peptones, protéoses,		
polypeptides	=	d - e
Azote non protéinique	=	e

Nous avons voulu, pour notre part, éviter ces écueils et nous contenter de doser directement l'ensemble des protéines du lactosérum autres que la caséine sans essayer de les fractionner en leurs constituants. Il nous a fallu séparer d'abord la caséine et ensuite isoler ces protides eux-mêmes. En effet, on aurait^{pu}/penser faire la réaction du biuret sur le lactosérum lui-même, mais cela est impossible parce que l'on doserait ainsi des protides autres que les holoprotéines et, de plus, il serait nécessaire en outre de se débarrasser du lactose qui, nous nous en sommes assurés, réduit à froid le réactif cuivrique alcalin utilisé dans le dosage. La dialyse, indiquée par Johnson et Ad Swanson, nous a paru être une opération trop longue pour être utilisée.

1/ Séparation de la caséine= obtention du lactosérum

Dans le lait de vache, on dose bien plus souvent la caséine que les holoprotéines. Aussi avons-nous choisi une méthode de séparation de la caséine qui permettra ultérieurement de la doser. Nous pourrions ainsi, sur la même prise d'essai, doser d'une part les holoprotéines et, d'autre-part, la caséine.

Dans leur technique de 1953, P.Fleury et Melle R.Eberhard, isolent la caséine à son point isoelectrique. A 1cm³ de lait dilué au dixième, ces auteurs ajoutent 0,05 cm³ de solution acétique au centième et centri-

fugent 5 minutes à 5000 tours/minute. C'est le liquide surnageant que nous avons utilisé pour notre travail.

Cependant, ce liquide surnageant est très riche en lipides; ceux-ci apparaissent nettement en surface. Nous avons donc dégraissé cette solution en l'agitant deux fois avec de l'éther, pensant que les protides n'étant pas solubles dans ce solvant, ne seraient pas entraînés par lui. Mais les éthers de lavage se prennent rapidement en gelée et nous avons vérifié qu'il n'y avait pas eu d'entraînement même par suite de solubilités réciproques. Ces éthers ont été agités avec une solution de chlorure de sodium; la solution aqueuse, chauffée, n'a laissé paraître aucun coagulum; au plus un léger louche s'est-il rarement manifesté.

C'est donc sur ce lactosérum dégraissé que nous avons séparé les holoprotéines.

2/ Thermocoagulation aqueuse

Si, au point de vue analytique, nous définissons les protéines par rapport aux autres protides comme les seuls composés qui, en présence de sels et en milieu acétique, coagulent par la chaleur, nous devons considérer que la technique par thermocoagulation aqueuse donne des résultats spécifiques et que, convenablement utilisée, elle doit être notre technique de référence. C'est pourquoi, malgré ses inconvénients d'ordre pratique, nous l'avons utilisée.

La concentration en sel nous a paru une condition très importante pour la technique de dosage. En effet, lorsque, pour un même lactosérum, nous avons fait croître la concentration en sulfate de sodium du milieu, la quantité de protides dosés à elle-même crû, au moins jusqu'à une certaine limite. Ainsi lorsqu'à 5 cm³ du liquide initial, nous avons

ajouté 1, 2,5, 5 ou 10 cm³ de solution aqueuse au cinquième de sulfate de sodium hydraté, les indications du photomètre furent 56, 58, 61 et 61. Aussi avons-nous adopté le mode opératoire suivant. (Ce résultat était d'ailleurs à prévoir car on sait que les électrolytes indispensables à la thermocoagulation sont à une concentration très faible dans le lait.)

A une quantité de lactosérum dégraissé, nous ajoutons le même volume d'une solution de sulfate de sodium décahydraté au cinquième, vérifions le pH au papier, l'ajustons aux environs de 4,5 si nécessaire, chauffons le mélange et centrifugeons. Les protides coagulés sont alors lavés à l'alcool puis à l'éther.

En raison de la spécificité de cette technique, c'est elle que nous avons utilisée pour étalonner nos appareils de mesure. Nous avons, par cette méthode, obtenu les protides d'un lait donné, d'une part nous les avons pesés et, d'autre-part, nous les avons dissous dans la soude normale et préparé des dilutions à 5, 10, 20, 40, 60 et 80 pour cent de cette solution; ces dilutions, traitées par addition de réactif de Gornall, nous ont servi à étalonner les photomètres dont nous nous sommes servis: monocellulaire de Rouy, bicellulaire de Meunier et de Bonet-Maury.

3/ Thermocoagulation alcoolique

Comme dans le cas des protéines sériques, la thermocoagulation en milieu alcoolique donne les mêmes résultats que la méthode de référence. C'est une technique très sûre, très simple, mais dont les conditions opératoires doivent être strictement observées.

A 2 cm³ de la lactosérum non dégraissé, on ajoute 20 cm³ d'alcool

à 95°C, vérifie le pH (4,6) au papier, porte 4 minutes au bain-marie et centrifuge aussitôt. Le coagulum est souillé de phosphate de calcium mais celui-ci, insoluble dans la soude, ne gêne pas le dosage. Il suffit de centrifuger pour l'éliminer.

Des essais, comparés avec la méthode de référence, nous ont montré qu'il était inutile de laver le coagulum à l'eau bouillante.

4/ Précipitation trichlorocétique

Nous avons utilisé le mode opératoire suivant: A 5 cm³ de lactosérum, nous avons ajouté 5 cm³ d'une solution aqueuse au cinquième d'acide trichloracétique, goutte à goutte et en agitant. Nous avons laissé 15 minutes au repos puis nous avons centrifugé pour séparer le précipité.

Le tableau n° 7 montre que les résultats obtenus par cette technique se montrent toujours plus élevés que ceux que l'on obtient par thermocoagulation.

5/ Précipitation tungstique

Après un certain nombre d'essais, nous avons utilisé le mode opératoire suivant. A 5 cm³ de filtrat, nous avons ajouté 5 cm³ de solution aqueuse au dixième de tungstate de sodium hydraté, puis goutte à goutte en agitant 5 cm³ d'acide sulfurique 2N/3. Après 15 minutes de repos, nous avons centrifugé. Les résultats obtenus par cette technique sont toujours plus élevés que ceux que l'on obtient par thermocoagulation; ils sont, par contre, très voisins de ceux que donne la précipitation trichloracétique.

6/ Précipitation phosphotungstique

La différence des résultats obtenus par coagulation et par précipitation peut être expliquée par la présence dans le précipité de polypeptides biurétogènes non coagulables par la chaleur. On sait que le dosage des polypeptides du sérum repose sur le fait qu'ils précipitent par l'acide trichloracétique mais non par l'acide phosphotungstique. C'est pourquoi nous avons essayé ce mode de précipitation. Contrairement à notre attente, les résultats obtenus étaient du même ordre que ceux que donnent les deux autres agents précipitants.

Tableau N° 7

N° des :	échantil- :	AC. Trichlor- :	Ac. Tungsti- :	Ac. Phospho- :	Chaleur en :	Chaleur en :
lons :	acétique :	que :	tungstique :	milieu sa- :	milieu :	alcooolique :
lin :						
1 :	3,6 :	3,7 :	- :	3,25 :	- :	
2 :	3,4 :	3,8 :	- :	3,1 :	- :	
3 :	4, :	4,4 :	- :	3, :	- :	
4 :	4,5 :	5, :	- :	3,8 :	- :	
5 :	4, :	4,40 :	- :	3,1 :	- :	
6 :	3,65 :	3,80 :	- :	3,5 :	3,5 :	
7 :	4, :	4,7 :	- :	3,60 :	3,55 :	
8 :	3,72 :	3,80 :	- :	3,42 :	3,45 :	
9 :	3,16 :	3,60 :	4, :	- :	- :	
10 :	2,5 :	2,5 :	2,45 :	2,25 :	2,22 :	
11 :	3,1 :	3,22 :	3,25 :	2,85 :	2,23 :	
12 :	3,37 :	3,80 :	3,37 :	2,68 :	2,55 :	

Influence du mode de séparation des protéines sur les résultats obtenus exprimés en grammes d'holoprotéines par litre de lactosérum.

Ainsi, quel que soit l'agent de précipitation choisi, les résultats obtenus sont sensiblement égaux et toujours plus élevés que ceux que donnent les différentes thermocoagulations. La différence a été,

dans nos expériences, comprise entre 2 et 22 pour cent, avec une moyenne de 11 pour cent. Nous avons alors tenté de savoir si, en lavant les précipités rassemblés au fond des tubes à centrifuger à l'aide des réactifs précipitants eux-mêmes, nous n'obtiendrions pas de meilleurs résultats. Nous pensions en effet à une surcharge entraînée lors de la précipitation. Les résultats obtenus après lavage étaient bien plus faibles que ceux que nous avions obtenu précédemment, mais cette diminution était à la fois trop forte et surtout trop irrégulière, la coagulation étant prise comme référence. Il semble qu'il soit possible d'interpréter ces faits en invoquant une solubilité non négligeable de ces précipités dans les liqueurs surnageantes. Et dans ce cas, nos expériences nous permettent de dire que les précipités obtenus au moyen de l'acide phosphotungstique sont moins solubles que les autres, lesquels ont à peu près les mêmes solubilités.

Nous nous sommes assuré que les liquides surnageant des protides coagulés étaient encore biurétogènes. C'est donc bien par la présence de polypeptides -ou plus exactement de protides non coagulables par la chaleur- que l'on doit expliquer l'excès que donnent les techniques de précipitation. De ce fait, nous proposerons un mode opératoire utilisant la coagulation des protéines.

Comme enfin, pour le dosage au biuret, l'emploi de la coagulation à chaud en milieu salin et acétique est d'un emploi assez pénible, nous recommandons l'emploi de la thermocoagulation alcoolique, technique très simple et très fidèle.

DOSAGE DE LA CASEINE ET DES HOLOPROTEINES DU LAIT DE VACHE
A L'AIDE DE LA REACTION DU BIURET

Principe: La caséine est précipitée du lait à pH voisin de 4,5 et soigneusement dégraissée par lavage à l'alcool et à l'éther. Les holoprotéines sont séparées par thermocoagulation en milieu alcoolique. Les protides ainsi isolés, traités par le réactif de Gornall pour la réaction du biuret, sont soumis à une mesure photométrique.

Réactifs :

1. Solution aqueuse au centième d'acide acétique,
2. Alcool à 95°
3. Ether officinal
4. Solution normale de soude
5. Réactif cuproalcalin de Gornall pour biuret

Sulfate de cuivre cristallisé $\text{SO}_4 \text{ Cu}$	50H ₂ -1,5g
Tartrate double de potassium	
et de sodium	6g
Soude décarbonatée	30g
Iodure de potassium	1g
Eau distillée	1 litre

Ce réactif doit être conservé dans un flacon paraffiné intérieurement.

Technique: Faites une dilution contenant 1 cm³ de lait pour 4cm³ d'eau. Dans un tube à centrifuger cylindro-conique de 15 cm³ environ, préalablement jaugé à 5 cm³, mesurez en mélangeant soigneusement.

Dilution du lait au 1/5° . . .	3 cm ³
Solution acétique (R 1) . . .	0,15 cm ³

Laissez se former le coagulum, puis centrifugez pendant cinq minutes à 5000 tours/minute. Séparez le liquide surnageant qui servira au dosage des holoprotéines. Vérifiez son pH 4,6 environ, ajustez au besoin.

a) Dosage de la caséine

Egouttez avec soin le culot de centrifugation, lavez-le en le remettant en suspension après chaque lavage deux fois avec 10 cm³ d'alcool à 95° (R 2) et deux fois avec 10 cm³ d'éther (R 3). Dissolvez le dans 1 cm³ de soude normale (R4) et complétez à 5 cm³ à l'aide de ce

même réactif. Prélevez 1 cm³ de cette solution dans le tube où vous ferez la réaction du biuret.

b) Dosage des holoprotéines

Introduisez dans un tube à centrifuger cylindrique en Pyrex, 20 cm³ d'alcool à 95° (R2), 2 cm³ de lactosérum, goutte à goutte en agitant. Placez ce tube verticalement dans un bain-marie bouillant, recouvrez le d'une petite capsule de Pyrex contenant quelques cm³ d'eau et un petit morceau de glace. Maintenez-le ainsi pendant 4 minutes. Centrifugez-le encore chaud 5 minutes à 5000 tours/minute. Jetez le liquide surnageant. Lavez le coagulum en le remettant en suspension après chaque lavage, une fois avec 10 cm³ d'alcool à 95° (R2) et deux fois avec 10 cm³ d'éther (R3). Dissolvez dans 1 cm³ de soude normale (R4).

c) Evaluation photométrique

A chacun des deux tubes précédents, ajoutez 4 cm³ de réactif de Gornall (R5) et laissez en repos 30 minutes à 20 - 25°. Séparez par centrifugation le précipité (phosphate de chaux). Préparez, en outre, un tube témoin en mélangeant 1 cm³ de soude normale (R4) et 4 cm³ de réactif de Gornall. Comparez aux courbes d'étalonnage que vous aurez obtenues précédemment et rapportez le résultat au litre de lait.

Nous avons appliqué cette technique au dosage d'un certain nombre d'échantillons de lait de vache pasteurisé, achetés à Paris, dans des crémeries. Nous avons trouvé des concentrations en holoprotéines variant de 2,2 à 3,8 g/l avec une moyenne de 3,1 g/l

Etablissement des courbes d'étalonnage

a) de la caséine

Dans un tube à centrifuger taré de 25 cm³ environ, mesurez

successivement :

Lait 4 cm³
Eau 16 cm³
Solution
acétique (R1) 0,25 cm³

Mélangez soigneusement, centrifugez cinq minutes environ à 4000/5000 tours minute. Décantez le liquide surnageant au moyen d'un petit siphon d'Ambard. Rincez la pointe du siphon avec un peu d'alcool (R2) et remettez le précipité en suspension dans 10 cm³ d'alcool à 95° (R2) et centrifugez. Répétez deux fois cette opération et faites, dans des conditions semblables, trois lavages à l'éther (R3). Séchez à 60-70° à poids constant et pesez. Dissolvez la caséine ainsi obtenue dans la soude normale pour obtenir un volume de 20 cm³. Diluez de façon à obtenir des prises d'essai de 1 cm³ contenant de 0,1 à 6 mg de caséine et continuez comme pour le dosage.

Remarque : Il est possible; plus simplement, de préparer les diverses dilutions de caséine au moyen d'une caséine commerciale telle que la caséine dégraissée Hoffmann La Roche.

b) des holoprotéines

Dans une fiole jaugée de 200 cm³, mesurez successivement :

Lait 40 cm³
Eau 150 cm³ environ
Solution acétique
(R1) 2,5 cm³

et complétez à 200 cm³. Mélangez soigneusement. Filtrez.

Recueillez 100 cm³ du filtrat et continuez le dosage par thermocoagulation en milieu salin comme il est classique pour l'urine.

Après pesée, dissolvez les protéides dans la soude normale pour obtenir un volume de 20 cm³. Diluez de façon à obtenir des prises

d'essai de 1 cm³ contenant de 0,1 à 6 mg de protides et continuez comme pour le dosage.

Remarque I - On peut, plus simplement, utiliser la courbe d'é-talonnage des protides sanguins (Fiches techniques -Généralités 8).

Remarque II - Il arrive quelquefois que des holoprotéines après pesée ne sont pas facilement solubles dans la soude normale; pour ce cas là, il faut faire le dosage en double.

RESUME ET CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons appliqué la réaction du biuret aux dosages du fibrinogène plasmatique et des holoprotéines du lait de vache. Nous avons utilisé le réactif décrit par Gornall et dont le Professeur P. Fleury et ses collaborateurs ont montré les qualités. Nous avons ainsi toujours pu compter sur une réaction finale fidèle, stable, sensible et précise.

Nous n'avons pas cru devoir retenir les procédés de séparation du fibrinogène fondés sur les techniques de relargage, en raison des résultats trop élevés auxquels elles conduisent. La coagulation par recalcification nous a paru demander trop de temps. Nous avons préféré utiliser la thrombine, enzyme que l'on trouve actuellement dans le commerce et qui permet une coagulation spécifique et rapide. Nous avons fixé un mode opératoire aussi simple que possible. En particulier, l'emploi de la centrifugation pour séparer la fibrine formée permet de conduire tout le dosage dans un seul tube à centrifuger.

L'application de cette technique à différents plasmas d'animaux nous a montré que les concentrations en fibrinogène du sang des Mammifères, étaient du même ordre.

Nous proposons d'associer à la technique de dosage de la caséine de P. Fleury et Melle R. Eberhard, une technique de dosage des holoprotéines du lactosérum. Ceux-ci sont coagulés par la chaleur en milieu alcoolique, dissous en milieu alcalin et dosés, par la réaction du biuret, en deux fractions.

Cette thermocoagulation (caractère spécifique des protéines) nous a permis de nous rendre compte de la présence dans le lait d'autres produits biurétogènes. Cette constatation justifie notre technique de séparation préalable des holoprotéines avant leur dosage par le biuret.

BIBLIOGRAPHIE (1)

- ARAYA ARAYA (J.) Farm. chil. 1951, 25, 159, in C.A. 1951
7181 d. (3)
- ARAYA ARAYA (J.) Farm. chil. 1952, 26, 204, in C.A. 1953
667 f. (3)
- ARDRY (R.) Ann. Biol. clin., 1954, 12, 168 (3)
- BADIN (J.) & BOUSSIER (G.)
Ann. Biol. clin. 1951, 9, 193 (13)
- BASERGA (A.) et DE NICOLA (P.)
in LEROUX (M.) et coll. (6)
- BRAND (E.), KASSELL (B.) & SAIDEL (L.J.)
J. am. chem. Soc. 1946, 68, 474 (11)
- CLARK (R.E.D.) Nature, London, 1951, 168, 876 (25)
- FLEURY (P.) Fiches techniques, Véga éd. Paris (9), (10), (27)
- FLEURY (P.) & EBERHARD (R.)
Ann. Biol. clin. 1951, 9, 453 (7) (9) (13)
- FLEURY (P.) & EBERHARD (R.)
Ann. pharm. fr. 1953, 11, 183 (30) (36)
- GEROK (W.) Klin. Wochschr. 1953, 31, 135
in CA 1953, 4406 i. (4)
- GORNALL, BARDAWILL & DAVID
Journ. biol. Chem. 1949, 177; 751. (7) (9)
- JACOBSON (K.) 1er Congrès Européen de Ch. clin.
Amsterdam, 1954. (6)
- JOHNSON (B.C.) & SWANSON (A.M.)
J. of Dairy Sc. 1952, 35, 823. (35) (36)
- KARUNINA (L.) & SHILOVICH (M.)
Mol. Prom. 1953, 14, 25, in C.A. 1953
5036 d. (35)

(1) Les nombres placés entre parenthèses renvoient aux pages de cette thèse.

- LARUELLE (P.) Le Sang, 1950, 21, 810 (5)
- LEROUX (M.), PRUGNAUD (R.) et FRIGOT (P.)
Ann. Biol. clin., 1952, 10, 142 (20)(22)
- LIAN (C.) & SASSIER (R.) Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris
1936, 24, 4 (5) (10) (14)
- LIAN (C.) et SASSIER (R.) Pr. Méd.
1942, 50, 491 (4)
- MARENZI (A.D.) & GOMEZ (C.J.)
Bull. Soc. Ch. biol.
1951, 33, 409 (3)
- MEHL (J.W.) J. Biol. Chem.,
1945, 157, 173 (7)
- MEHL (J.W.), PACOVSKA (E.) & WINZLER (R.J.)
J. Biol. Chem. 1949, 177, 13 (7)
- MEUNIER (P.) Ann. Biol. Clin., 1940, 22, 599 (4)
- MOIR (G.M.) Analyst, 1931, 56, 228 (34)
- PALMER (A.H.) J. Biol. Chem.
1934, 104, 359, d'après PERCEAU (R.) (31)
- PERCEAU (R.) Bull. Soc. chim. Fr.
1950, 17, D.115 (32)
- PETERS (S.) & VAN SLYKE (D.)
Quantitative Clinical Chemistry
William & Wilkins, éd. Baltimore, 1942, 1 (11)
- ROBINSON (H.W.) & HOGDEN (C.G.)
J. Biol. Chem. 1940, 135, 707 & 727 (7)
- SASSIER (R.) Voir LIAN & SASSIER (R.) (4)
- SHAHANI (K.M.) & SOMMER (H.H.)
J. Dairy Soc. 1951, 34, 1003 (35)
- VANDEGAER (J.E.) & MIETTINEN (J.K.)
Acta Chem. Scand. 1953, 7, 1239 (33)
- WEICHSELBAUM (T.E.) Amer. J. clin. Path. - Tech. Sect.
1946, 10, 40 (7)
-

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	I
<u>1re PARTIE</u>	
CHAPITRE I - Etude critique du dosage du fibrinogène plasmatique	1
CHAPITRE II - Application de la réaction du biuret au dosage du fibrinogène plasmatique	9
I/ Application de la réaction du biuret au dosage du fibrinogène ou de la fibrine	9
II/ Isolement du fibrinogène ou de la fibrine	11
A. Essai par relargage	12
B. Essai par coagulation calcique	14
C. Isolement de la fibrine par formation du caillot au moyen de thrombine;	18
III/ Séparation de la fibrine	23
IV/ Mise en solution de la fibrine	24
V/ Mode opératoire proposé	25
CHAPITRE III - Le fibrinogène chez les Mammifères	28
<u>2me PARTIE</u>	
CHAPITRE I - Application de la réaction du biuret au dosage des holoprotéines du lait de vache	30
I/ Séparation de la caséïne. Obtention du lactosérum	36
II/ Dosage de la caséïne et des holopro- téines du lait de vache à l'aide de la réaction du biuret	42
III/ Etablissement des courbes d'étalon- nage	43
RESUME & CONCLUSION	46
BIBLIOGRAPHIE	48

